ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI GENOVA
diretto dal Prof. **PIETRO CANALIS**

La reazione delle precipitine come mezzo di diagnosi della peste

per il Dr. LUIGI PIRAS, assistente

Estratto da "L'IGIENE MODERNA"
ANNO V - N. 8

NOVI LIGURE
TIPOGRAFIA COOPERATIVA
1913

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI GENOVA

diretto dal Prof. PIETRO CANALIS

La reazione delle precipitine come mezzo di diagnosi della peste

per il Dr. LUIGI PIRAS, assistente

Estratto da "L'IGIENE MODERNA,,

ANNO V - N. 8

NOVI LIGURE

TIPOGRAFIA COOPERATIVA

1913

ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI GENOVA

diretto dal Prof. **PIETRO CANALIS**

La reazione delle precipitine come mezzo di diagnosi della peste

per il Dr. **LUIGI PIRAS**, assistente

Allo stato attuale delle nostre conoscenze la diagnosi batteriologica della peste si fa con l'esame microscopico, con la coltura nei mezzi nutritivi e con l'inoculazione del materiale pestoso negli animali (cavie, topi) per via intraperitoneale, o sottocutanea, o delle mucose, o per via cutanea, sfregando la sostanza sulla pelle rasata o depilata. Isolato il bacillo della peste si può ricorrere per la sua identificazione alla reazione agglutinante col siero specifico.

Le maggiori difficoltà per l'accertamento della diagnosi si incontrano quando il materiale sospetto è in putrefazione; in tal caso non si può fare assegnamento sulle colture nei mezzi nutritivi, dove facilmente i germi saprofiti prendono il sopravvento, ed anche le inoculazioni negli animali possono dopo un certo tempo non rispondere allo scopo, o perchè i germi della peste sono già scomparsi nella concorrenza coi germi della putrefazione, o perchè sono attenuati per l'azione dei prodotti del processo putrefattivo, o perchè prendono il sopravvento altri germi patogeni coesistenti nel materiale in esame.

Difatti, esaminando cadaveri di topi putrefatti sicuramente pestosi, Kister e Schumacher (1), che fecero uno dei lavori più accurati su questo argomento, sopra *quarantatrè* esperimenti solo in *ventisei* poterono stabilire sicuramente, con l'inoculazione negli animali, la diagnosi di peste, mentre in *diciasette* la prova diede risultato negativo.

Dopo *sette* fino a *ventidue* giorni di putrefazione alla temperatura di 10° C. la peste si poteva dimostrare con questo metodo regolarmente, al *ventitreesimo* giorno si ebbe il primo risultato negativo, e negli *undici* cadaveri conservati più di *ventidue* giorni solo in *cinque* si potè stabilire con sicurezza la diagnosi di peste. Tenendo invece i cadaveri alla tempe-

ratura di 20° C., l' esperimento negli animali diede risultato positivo in *dieci* casi e negativo in *undici*, in queste condizioni poterono stabilire regolarmente la diagnosi di peste soltanto fino al *sesto* giorno. Già dopo *sette* giorni ebbero *un* risultato negativo per *tre* positivi, e più in là sopra *dodici* cadaveri di topi esaminati dall' *ottavo* al *quindicesimo* giorno solo in *due* (e cioè in uno di *otto* giorni ed in un altro di *undici*) poterono stabilire la diagnosi di peste.

Di quì la sentita necessità di ritrovare un metodo il quale permetta di fare la diagnosi sopra un materiale pestoso in putrefazione anche quando non è più dimostrabile in esso il bacillo della peste.

Grysez e Wagon (2) tentarono di applicare a questo scopo la fissazione del complemento per la ricerca di antigeni specifici in estratti di organi di animali di laboratorio (topi, cavie), morti di peste sperimentale e in diverso grado di putrefazione. Essi poterono constatare che dosi notevoli di complemento sono fissate quando si mette a contatto siero antipestoso con estratti di questi organi, mentre non sono fissate neanche minime dosi se, invece del siero antipestoso, si adopera siero normale, siero antidifterico, siero antitetanico, ecc., oppure invece di estratto di organi pestosi, estratto di organi non pestosi in qualunque grado di putrefazione. Constatarono inoltre che la reazione è tanto più netta quanto più è avanzato il grado di putrefazione degli organi, crescendo la quantità di complemento fissata coll' aumentare della putrefazione. Così in organi pestosi conservati in soluzione fisiologica ebbero risultato positivo al *trentasettesimo* giorno, nel formolo all' 1 0|0 al *trentunesimo*, nella glicerina al *diciottesimo* e non più al trentunesimo giorno.

*
* *

Per quanto mi sappia queste ricerche non furono ancora controllate da altri osservatori, per cui mi proposi di fare qualche esperienza di riprova sopra estratti di milza e di fegato (*) di topi morti di peste sperimentale e tenuti alla temperatura di 18° - 20° C. Gli estratti venivano preparati seguendo una tecnica eguale a quella usata nel laboratorio di Wassermann per la preparazione dell' antigene per la siero-diagnosi della sifilide:

ad *una* parte di organo, finemente triturata, aggiungevo *quattro* parti di soluzione fisiologica di Na Cl al 0,85 0|0 contenente il 0,5 0|0 di fenolo; mettevo la soluzione in un recipiente di color bruno e infine in un apparecchio da scuotere, tenuto in movimento per ventiquattro ore, quindi centrifugavo e decantavo il liquido che, dopo sedimentazione, rappresentava l' antigene pronto per l' uso.

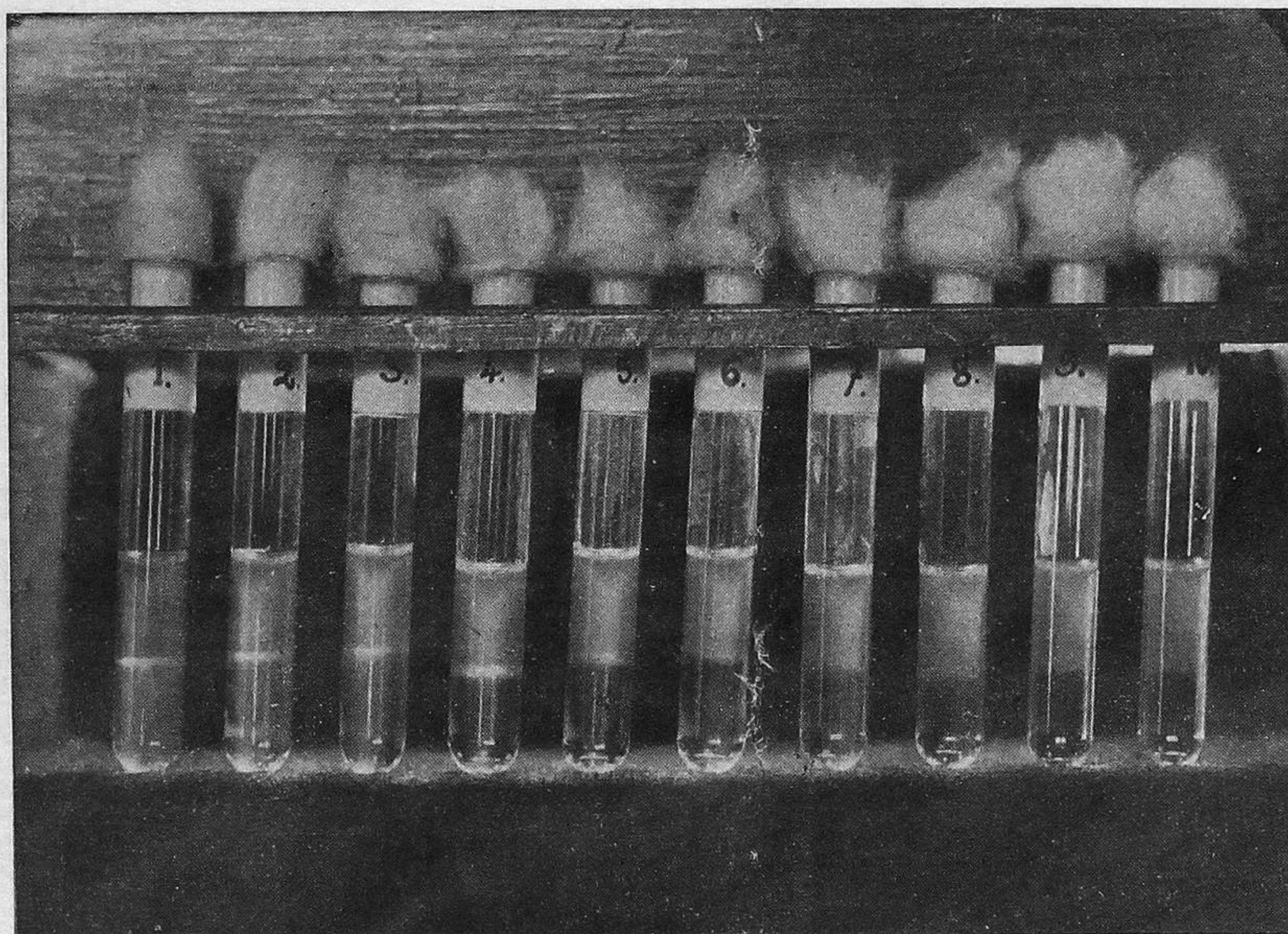
I risultati non furono però soddisfacenti: la fissazione del complemento mi diede risultato positivo solo sino al *sesto* giorno.

Evidentemente la fissazione del complemento nella diagnosi della peste sopra cadaveri putrefatti non aveva maggior valore della inoculazione negli animali.

Volli allora vedere se negli estratti degli organi pestosi esistesse un precipitinogeno specifico, capace di dare, con la precipitina del siero antipestoso, una reazione di precipitazione,

(*) Prescelsi questi organi giacchè sono quelli che di solito presentano il maggior numero di bacilli.

L'IGIENE MODERNA Vol. 6°, n.° 8

PIRAS - *La reazione delle precipitine come mezzo di diagnosi della peste.*

Questa figura riproduce l'esperienza fatta con 0.5 cc. di estratto di organo di topo pestoso, morto da *20* giorni, e quantità decrescenti di siero antipestoso (0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 0.00625).

L'anello di precipitazione si ha nei tubi 1-6; nel tubo 7 si ha solo n vago accenno; non si ha nei tubi di controllo 8, 9, contenenti ognuno 0.5 cc. d'estratto di organo pestoso e 0.5 cc. di siero *non* antipestoso, e 10, contenente 0.5 cc. d'estratto d'organo *non* pestoso e 0.5 cc. di siero antipestoso.

la quale potesse servire per la diagnosi, analogamente a quanto A. Ascoli e Valenti (3) prima, A. Ascoli (4), Bierbaum (5), Pfeiler (6), Roncaglio (7), Zibordi (8), Favero (9), Granucci (10), De Gasperi (11), Casalotti (12), Lebre (13), ecc., poi hanno trovato per il carbonchio ematico, A. Ascoli (14) prima, Silva (15), Iwicki (16), Zagaja (17), Isabolinsky e Patzewitsch (18), Gauss (19), ecc., poi per il mal rosso dei suini, Reinhart (20) per l' infezione da paratifo negli animali, Hecht (21) per il carbonchio sintomatico.

Che nel siero antipestoso esistessero precipitine specifiche per i filtrati di colture di bacillo della peste era già stato dimostrato dalle ricerche di Kraus (22), confermate da quelle di Taranuchin (23) e di Bielonowsky (24), a me non restava quindi che ricercare il precipitinogeno specifico negli organi pestosi.

Con esperienze preliminari mi assicurai dell' esistenza delle precipitine specifiche nel siero antipestoso di cui ero in possesso (un siero agglutinante il bacillo della peste, del titolo 1/1000, preparato dall' Istituto sieroterapico e vaccinale di Berna) e cercai dimostrarne la quantità.

Adoperai perciò come precipitinogeno un estratto di bacilli della peste, ottenuto da una sospensione in acqua distillata, tenuta nell' apparecchio da scuotere in movimento per ventiquattro ore, e (previa aggiunta del 0,5 0/0 di di fenolo) centrifugata sino ad avere un liquido limpido. Questo liquido rappresentava l' estratto, il quale era dunque preparato col processo seguito da Wassermann e Citron per preparare le aggressine artificiali acquose.

Per la reazione di precipitazione seguii la tecnica proposta da Fornet (25), con la quale si ha una precipitazione in forma di anello quando si versi in tubetti di assaggio il siero contenente la precipitina e si sovrapponga ad esso l'estratto contenente il precipitinogeno.

Questo metodo ha il vantaggio di rendere evidente la reazione anche per minime quantità di precipitinogeno e permette l' uso di liquidi non assolutamente limpidi e non sterili, giacchè la reazione positiva si ha entro due ore al massimo, quindi prima che lo intorbidamento che consegue allo sviluppo abbondante di germi possa mascherarla.

I risultati ottenuti sono esposti nella tabella a pag. 6:

Questa esperienza confermava che nel siero antipestoso agglutinante di cui disponevo esistevano, al titolo di 1 : 160, precipitine specifiche rispetto ad un estratto di bacilli della peste.

Passai quindi alla ricerca del precipitinogeno specifico negli estratti di milza e di fegato di topi e cavie morti di peste sperimentale, preparati come ho già detto.

I risultati ottenuti furono subito molto soddisfacenti: nella superficie di contatto del siero antipestoso con lo estratto degli organi si formava sempre, quasi istantaneamente, un anello di precipitazione, che dopo qualche minuto diventava evidentissimo, mentre non si formava mai nei controlli fatti sostituendo al siero antipestoso il siero normale di cavallo, il siero antidifterico, il siero antistreptococcico, il siero antidiplococcico ecc., diluiti o non, freschi o inattivati a 55° C., da 1 ora a 48-50 ore, oppure adoperando, al posto del materiale pestoso, estratto di fegato e milza di topi morti in seguito ad inoculazione di bacillo *thypi murium*, di bacillo *Ratten-Danytz*, di bacillo del carbon-

chio, di bacillo *suisepticus*, o morti per azione prolungata del cloroformio, della anidride solforosa, ecc.

Tutti i metodi provati per l'estrazione del precipitinogeno, e che più che altro si differenziano per il liquido di estra- a *dieci* parti di soluzione fisiologica di Na Cl, e nel filtrare il liquido così ottenuto sul quale si fa agire il siero. Esso ha sugli altri il vantaggio della semplicità e della rapidità, e per questo lo preferii nelle mie ricerche.

Estratto di bacilli pestosi	Siero antipestoso in esame	Soluzione fisiologica di Na Cl	Comparsa della reazione di precipitazione		
			subito	dopo 5' a 37° C.	dopo 2 ore a 37° C.
0,5 cc.	0.1 cc.	sino ad 1 cc.	±	++	+++
"	0.05 "	"	—	+	+++
"	0.025 "	"	—	+	+++
"	0.0125 "	"	—	—	++
"	0.00625 "	"	—	—	+
"	0.003125 "	"	—	—	±
"	0.0015625 "	"	—	—	—

+++ = reazione precipitante molto evidente
++ = " " bene evidente
+ = " " evidente (*)
± = " " dubbia
— = " " negativa

I risultati dei controlli fatti con estratti di bacilli non pestosi o con siero non antipestoso furono sempre negativi.

zione, mi corrisposero egualmente bene, così mi corrispose anche bene il metodo proposto da A. Ascoli per l' estrazione del precipitinogeno specifico da organi carbonchiosi, che consiste nel far bollire per 5' *una* parte dell'organo in esame, finemente triturata, con *cinque*

(*) Questi segni hanno eguale significato anche nelle tavelle seguenti.

Per la estrazione del precipitinogeno l'acqua distillata però è preferibile alla soluzione fisiologica di Na Cl colla quale l'estratto ha densità maggiore del siero, il che rende difficile, nei tubetti d'assaggio, il galleggiamento dell'estratto, quando le ricerche si fanno col siero precipitante diluito.

Accade poi abbastanza spesso che

gli estratti, anche filtrati ripetutamente alla carta o attraverso la lana di amianto, rimangano opalescenti quindi non adatti per la reazione. In tali casi si riesce ad ottenere un liquido perfettamente limpido filtrandolo attraverso un batuffolo di lana d'amianto sotto pressione.

Sperimentai col metodo sopradescritto su estratti di diversi organi di topi pestosi (milza, fegato, polmoni, cuore, reni, muscoli) e trovai risultati diversi secondo i diversi organi, come è esposto nella seguente tabella:

Organo	Quantità di estratto	Siero antipestoso	Soluzione fisiologica di Na Cl.	Comparsa della reazione di precipitazione		
				subito	dopo 5' a 37° C.	dopo 2 ore a 37° C.
Milza	0,5 cc.	0,1 cc.	sino ad 1 cc.	+	++	+++
Fegato	"	"	"	+	++	+++
Polmone	"	"	"	—	+	++
Cuore	"	"	"	—	—	+
Rene	"	"	"	—	—	+
Muscolo	"	"	"	—	—	+

I risultati dei controlli fatti con estratti di organi non pestosi o con siero non antipestoso furono sempre negativi.

Come si vede la maggior quantità di precipitinogeno si ottiene adoperando il fegato e la milza, perciò nelle ricerche ulteriori mi servii di estratti ottenuti da questi organi messi insieme.

Dopo ciò passai a studiare per quanto tempo nei cadaveri dei topi morti di peste e lasciati putrefare si potesse far la diagnosi colla reazione delle precipitine.

Inoculai perciò per via sottocutanea con bacilli pestosi un certo numero di ratti bianchi e di decumani (*), quando essi venivano a morire, i cadaveri erano tenuti in un ambiente nel quale la temperatura oscillava tra 22°-25° C., e a diversi periodi sag-

(*) Mentre eseguivo queste esperienze ebbi occasione di esaminare un topo pestoso proveniente da un capannone del porto, in cui si era sviluppata una limitata epizoozia pestosa nei topi, il cadavere era in stato di discreta putrefazione per cui, senza grande difficoltà, riuscì al Prof. Zirolia, Aiuto dell' Istituto, di isolare il bacillo della peste coll'inoculazione nella cavia; fatta la prova della reazione delle precipitine questa mi diede risultato nettamente positivo.

giavo col metodo anzidetto l' estratto di milza e di fegato. Contemporaneamente facevo sempre colture per striscio su gelatina e su agar con succo gangliare, con polpa splenica e con sangue del cuore. Inoculavo quindi una cavia per via cutanea con un pò di polpa splenica, cioè rasando abbondantemente la pelle dell'addome, e su questa superficie strofinando la quantità maggiore possibile di materiale, ed una altra cavia per via sottocutanea, mettendo nel modo più sterile possibile un pezzo di milza in una saccoccia fatta sotto la cute.

Per maggior intelligenza riproduco il protocollo di una esperienza:

Topo morto di peste da *venti* giorni e tenuto alla temperatura di 22°–25° C.

Estratto di organo pestoso	Siero antipestoso	Soluzione fisiologica di Na Cl.	Comparsa della reazione di precipitazione		
			subito	dopo 5' a 37., C.	dopo 2 ore a 37o C.
0.5 cc.	0. 5 cc.	sino ad 1 cc.	+	++	+++
"	0. 2 "	"	—	+	+++
"	0. 1 "	"	—	±	+++
"	0. 05 "	"	—	—	++
"	0. 025 "	"	—	—	++
"	0. 0125 "	"	—	—	+
"	0.00625 "	"	—	—	—

I risultati dei controlli fatti con estratto di organi non pestosi e con siero non antipestoso furono sempre negativi.

Contemporaneamente a queste esperienze, in cui tenendo fissa la quantità dell'estratto variavo le quantità di siero, ne facevo sempre altre nelle quali tenevo fissa la quantità di siero e variavo la quantità di estratto.

Ricercavo così sino a quanto potevo spingere la diluizione dell'estratto senza che il risultato nella reazione si modificasse.

I risultati di queste ricerche mi erano utili anche, come già quelli delle precedenti, per poter paragonare la quantità di precipitinogeno estraibile nelle diverse esperienze e per vedere se questa quantità subisse modificazioni in rap-

porto col grado di putrefazione dei cadaveri dei topi.

Anche di queste esperienze riproduco un protocollo:

Topo morto di peste da *ventisei* giorni e tenuto alla temperatura di 22°-25° C.

Estratto di organo pestoso	Siero antipestoso	Soluzione fisiologica di Na Cl.	Comparsa della reazione di precipitazione		
			subito	dopo 5' a 37° C.	dopo 2 ore a 37° C.
0. 5 cc.	0.1 cc.	sino ad 1 cc.	±	++	+++
0. 2 "	"	"	—	±	+++
0. 1 "	"	"	—	—	+++
0. 05 "	"	"	—	—	++
0. 025 "	"	"	—	—	+
0. 0125 "	"	"	—	—	±
0.00625 "	"	"	—	—	—

I risultati dei controlli fatti con estratti di organi non pestosi o con siero non antipestoso furono sempre negativi.

I risultati ottenuti da tutti i topi esaminati, sia facendo la ricerca diretta del bacillo della peste colle colture, sia facendo la ricerca indiretta colla inoculazione cutanea e sottocutanea nelle cavie, sono riassunti nella seguente tabella a pag. 10.

Questa tabella permette di rilevare il valore della reazione delle precipitine per stabilire la diagnosi su d'un materiale pestoso abbandonato alla putrefazione.

Mentre infatti l' isolamento diretto del bacillo della peste mi riuscì solo sino al *quinto* giorno e non più al *sesto* e l' isolamento per mezzo dell' inoculazione del materiale per via cutanea e sottocutanea rispettivamente sino al *decimo* e non più al dodicesimo (però dopo il sesto giorno irregolarmente) e al *dodicesimo* giorno e non più al quattordicesimo, la reazione delle precipitine riuscì sempre positiva sino al *sessantottesimo* giorno, quando i cadaveri dei topi erano già disseccati.

È da notare però che mentre 0,5 cc. di estratto al *terzo* o *quarto* giorno dalla morte degli animali dava reazione ben evidente anche con 0.00625 cc. di siero antipestoso, al *ventesimo* giorno questa si aveva soltanto con 0.0125 cc., al *cinquantasettesimo* giorno solo con 0.05 cc.

Risultati delle ricerche istituite per accertare la diagnosi di peste mediante:
a) le colture fatte direttamente dal materiale in esame,
b) l'inoculazione cutanea nella cavia,
c) l'inoculazione sottocutanea nella cavia,
d) la reazione delle precipitine,
sopra cadaveri di topi morti di peste e tenuti a 22° - 45° C.

N. giorni trascorsi dalla morte dell'anim.	Stato di conservaz. del cadavere	Colture fatte direttamente dal materiale in esame	Esito dell' inoculazione cutanea nella cavia	Esito della inoculazione sotto cutanea nella cavia	Reazione delle precipitine
1	buono	bacilli pestosi	la cavia muore di peste all'8° giorno	la cavia muore di peste al 6° giorno	posit.
2	"	"	" " 10° "	" " 5° "	"
3	putr. iniz.	"	" " 9° "	" " 7° "	"
4	"	"	" " 9° "	" " 7° "	"
5	putref.	"	" " 11° "	" d'inf. mista al 3° "	"
6	"	assenz. di bac. pestosi	" " 6° "	" di peste all'8° "	"
8	"	"	" vive	" " 5° "	"
10	putr. avan.	"	" muore di peste all'8° giorno	" " 9° "	"
12	"	"	" vive	" " 8° "	"
14	putr. avan.	"	" "	" vive	"
16	"	"	" "	" "	"
18	"	"	" "	" "	"
20	"	"	" "	" "	"
23	"	"	" "	" "	"
26	"	"	" "	" "	"
29	"	"	" "	" "	"
32	"	"	" "	" "	"
36	inizio dissecc.	"	" "	" "	"
40	"	"	" "	" "	"
44	dissecc.	"	" "	" "	"
48	"	"	" "	" "	"
52	"	"	" "	" "	"
56	"	"	" "	" "	"
68	"	"	" "	" "	"

Inoltre mentre lo stesso estratto, *pochi* giorni dopo la morte dei topi anche se diluito 1 : 120 dava la reazione delle precipitine con 0.1 cc. di siero antipestoso, al *ventiseiesimo* giorno la dava solo diluito 1 : 60, al *cinquantasettesimo* giorno diluito 1 : 30 e infine al *sessantottesimo* giorno colla diluizione 1 : 20.

Da queste esperienze ho avuto una estesa conferma delle precedenti, le quali mi autorizzano ad affermare che, mediante la reazione delle precipitine, si può fare la diagnosi di peste nei cadaveri dei topi abbandonati alla putrefazione fino al *sessantottesimo* giorno, vale a dire quando la diagnosi non è possibile coi soliti metodi.

Finora io avevo sperimentato sopra un solo topo per i singoli periodi della putrefazione, però per meglio accertare la portata del metodo e la costanza dei suoi risultati ripetei le esperienze sopra *trenta* decumani, che poi esaminai al *decimo*, *dodicesimo* e *quindicesimo* giorno dalla morte; i cadaveri furono tenuti, ben inteso, alla temperatura solita di 22° - 25° C.

Prescelsi questi periodi perchè, come mi risultava dalle esperienze riportate nella tabella precedente, segnavano il punto in cui, colle inoculazioni negli animali, il risultato incominciava ad essere dubbio e frequentemente negativo.

I risultati di questa serie di ricerche sono esposti nelle seguenti tabelle:

Risultati delle ricerche istituite per accertare la diagnosi di peste mediante:
a) le colture fatte direttamente dal materiale in esame,
b) l'inoculazione cutanea nella cavia,
c) l'inoculazione sottocutanea nella cavia,
d) la reazione delle precipitine,
sopra cadaveri di topi morti di peste da **dieci** *giorni e tenuti a 22° - 25° C.*

N. d'ordine	Stato di conservazione del cadavere	Colture fatte direttamente dal materiale in esame	Esito della inoculazione cutanea nella cavia	Esito della inoculazione sottocutanea nella cavia	Reazione delle precipitine
1	putr. avanz.	ass. di bac. pestosi	la cavia vive	la cavia muore di peste al 9° g.	positiva
2	»	»	» »	» vive	»
3	»	»	» muore di peste al 13° g.	» muore di peste all'8° g.	»
4	»	»	» vive	» muore d'inf. mista al 4° g.	»
5	»	»	» muore di peste al 9° g.	» muore di peste all'11° g.	»
6	»	»	» vive	» vive	»
7	»	»	» muore di peste all'11° g.	» muore di peste all'8° g.	»
8	»	»	» vive	» » 6. »	»
9	»	»	» »	» vive	»
	»	»	» muore di peste all'8° g.	» muore d'inf. mista al 4° g.	»

Risultati delle richerche istituite per accertare la diagnosi di peste mediante:
a) le colture fatte direttamente dal materiale in esame,
b) l'inoculazione cutanea nella cavia,
c) l'inoculazione sottocutanea nella cavia,
d) la reazione delle precipitine,
sopra cadaveri di topi morti di peste da **dodici** *giorni e tenuti a 22°-25°.*

N. d'ordine	Stato di conservazione del cadavere	Colture fatte direttamente dal materiate in esame	Esito dell' inoculaz. cutanea nella cavia	Esito dell'inoculazione sottocutanea nella cavia	Reazione delle precipitine
11	putref. avanz.	assen. di bac. pestosi	la cavia vive	la cavia muore di peste al 6° giorno	positiva
12	"	"	"	" " 8° "	"
13	"	"	"	" vive	"
14	"	"	"	" muore d'inf. mista al 3° "	"
15	"	"	"	" vive	"
16	"	"	"	" muore di peste al 10° "	"
17	"	"	"	" vive	"
18	"	"	"	" "	"
19	"	"	"	" muore di peste al 7° "	"
20	"	"	"	" vive	"

Da queste tabelle si vede che:

1) colle colture dirette nei mezzi artificiali non mi è riuscito di isolare il bacillo della peste dai cadaveri dei topi in putrefazione dopo il *decimo* giorno;

2) coll' inoculazione cutanea nella cavia mi è riuscito di isolarlo dopo *dieci* giorni in *quattro* casi su *dieci* e quindi nel 40 0/0 dei casi, mentre non mi è riuscito mai dopo *dodici* e *quindici* giorni;

3) coll' inoculazione sottocutanea invece ottenni migliori risultati giacchè mi riuscì di isolare il bacillo della peste in *sette* casi su *dieci*, e quindi nel 70 0/0 dei casi, dopo *dieci* giorni, in *cinque* casi sopra *dieci*, e quindi del 50 0/0 dei casi, dopo *dodici* giorni, tuttavia dopo *quindici* giorni il risultato fu negativo nella totalità dei casi, *dieci su dieci*;

4) migliori risultati ottenni sempre colla reazione delle precipitine, essendomi essa riuscita costantemente positiva dopo *dieci*, *dodici*, *quindici* giorni di putrefazione.

Questo processo poi, oltre alla sicurezza e costanza del risultato, ha pure il vantaggio della semplicità e speditezza, difatti, mentre coll'inoculazione negli animali dobbiamo aspettar *tre*, *quattro* e *più* giorni, per conoscere l' esito della prova, la reazione delle

Risultati delle ricerche istituite per accertare la diagnosi di peste mediante:
a) le colture fatte direttamente dal materiale in esame,
b) l'inoculazione cutanea nella cavia,
c) l'inoculazione sottocutanea nella cavia,
d) la reazione delle precipitine,
sopra cadaveri di topi morti di peste da **quindici** *giorni e tenuti a 22° 25°*

N. d'ordine	Stato di conservazione del cadavere	Colture fatte direttamente dal materiale in esame	Esito della inoculazione cutanea nella cavia	Esito della inoculazione sottocutanea nella cavia	Reazione delle precipitine
21	putrefaz. avanzatissima	assenza di bac. pestosi	la cavia vive	la cavia vive	positiva
22	"	"	" "	" "	"
23	"	"	" "	" "	"
24	"	"	" "	" "	"
25	"	"	" "	" "	"
26	"	"	" "	" "	"
27	"	"	" "	" "	"
28	"	"	" "	" "	"
29	"	"	" "	" "	"
30	"	"	" "	" "	"

precipitine si fa in *pochi minuti* ed il risultato si può avere *istantaneamente* o al massimo entro *due ore*.

* * *

Il metodo può trovare utile applicazione nella vigilanza sui topi dei porti e delle navi che vi giungono da paesi infetti di peste.

Accade infatti frequentemente tanto nei magazzeni portuali, come nelle stive dei bastimenti, di trovare cadaveri di topi in avanzata putrefazione e sui quali si devon fare delle indagini per escludere od accertare la diagnosi di peste.

Evidentemente nella reazione delle precipitine da me studiata, noi abbiamo un mezzo più rapido e più sicuro, per raggiungere lo scopo, che non l'inoculazione negli animali.

Qualche volta però non si può fare l'indagine sui topi perchè per una ragione qualunque furono distrutti o dispersi e non abbiamo a disposizione che le loro feci o le merci con esse inquinate. Mi è sembrato perciò interessante di provare se, colla reazione delle precipitine, si riuscisse a dimostrare la provenienza pestosa di queste feci anche quando non si riesce più a isolare da esse il bacillo della peste.

Maassen (26) riuscì a dimostrare i bacilli pestosi solo dopo *un* giorno nelle feci secche e fino a *quattro* giorni nelle feci tenute umide artificialmente, Otto (27) li trovò vivi da *uno* a *tre* giorni, a seconda della temperatura cui erano tenute.

Io presi le feci di topi inoculati di peste e le tenni all'oscuro e alla temperatura media di 15° C. in una scatola di Petri, quindi a diverso periodo di tempo emulsionavo una diecina di coccole fecali in 10–15 cc. d'acqua distillata, lasciandole per un' ora a 37°, e poi ne facevo l'estratto seguendo lo stesso metodo di A. Ascoli, che, anche per questo materiale, mi diede risultato migliore degli altri per la rapidità.

Riporto nella seguente tabella i risultati ottenuti:

Risultati delle ricerche fatte su feci di topi pestosi tenute all'oscuro e alla temperatura media di 15° C.

Num. dei giorni trascorsi dall' emissione delle feci	Esito dell' inoculazione sottocutanea nella cavia	Reazione delle precipitine
2	la cavia muore d'infez. mista al 2° giorno	positiva
3	" " di peste all' 8° "	"
4	" " 7° "	"
5	" vive	"
7	" "	"
10	" "	"
15	" "	"
20	" "	"
30	" "	"
40	" "	"

Da queste esperienze si vede che la reazione delle precipitine può servire a dimostrare l'origine pestosa delle feci dei topi anche dopo *quaranta* giorni dalla emissione, dopo un periodo cioè assai più lungo di quello in cui si può stabilire la diagnosi coll' inoculazione negli animali.

Anche quì si vede che la quantità di siero necessaria per ottenere la reazione va aumentando colla durata della conservazione infatti il *giorno dell'emissione* bastano 0.02 cc. di siero per dare la reazione con 0.5 cc. di estratto di feci, dopo *dieci* giorni ne occorrono 0.05 cc., dopo *venti* 0.1 cc. e dopo *quaranta* 0.2 cc.

* * *

Riassumendo io credo di aver dimostrato: *che negli organi degli animali (topi e cavie) morti di peste esiste un precipitinogeno specifico per le precipitine del siero antipestoso, il quale persiste e dà una reazione caratteristica anche nei cadaveri in avanzatissima putrefazione; che la stessa sostanza si trova nelle feci dei topi pestosi; che questa reazione, essendo nettamente specifica, può essere utilizzata per accertare la diagnosi di peste anche quando, per lo stato di avanzata putrefazione o di essiccamento, tutti gli altri mezzi di diagnosi falliscono.*

Per apprezzare la praticità del metodo da me proposto bisogna anche tener conto della facilità con cui possiamo procurarci il siero antipestoso dagli istituti sieroterapici o con cui possiamo produrlo nel laboratorio.

Io ho trovato che tanto il siero antipestoso agglutinante del titolo 1: 1000, come quello del titolo 1: 750, come il siero antipestoso preparato a scopo terapeutico dall'Istituto sieroterapico e vaccinale di Berna servono egualmente bene per la reazione. Nel corso delle mie esperienze poi me ne ho procurato immunizzando un coniglio; sono state sufficienti *due* iniezioni sottocutanee, *una* in peritoneo e *una* intravenosa, fatte di cinque in cinque giorni, inoculando complessivamente *nove* colture uccise di bacillo della peste, su tubi comuni di agar obliquo, dell'età di quattro giorni, per ottenere un siero il quale aveva un titolo precipitante uguale agli altri sieri adoperati.

Spero perciò che il metodo della reazione delle precipitine troverà larga applicazione nella profilassi della peste, di cui l'accertamento rapido e sicuro della diagnosi nei topi e nei materiali pestosi è uno dei cardini fondamentali.

LAVORI CITATI

1) Kister und Schumacher. *Zeitschr. f. Hyg.* Bd. 51.

2) Grysez et Wagon *C. R. Soc. de Biologie,* t. 70.

3) A. Ascoli e Valenti - *Biochimica e Terapia sper.* t. II.; *La Clinica Veterinaria,* 1910, ecc.

4) A. Ascoli - *La Clinica Veterinaria,* 1911; *C. R. Soc. Biologie,* t. *LXX*; *Centralbl. f. Bakt. Abt.* I. O. Bd. 58, ecc.

5) Bierbaum - *Berl. tierärztl. Woch,* 1911.

6) Pfeiler - " " " "

7) Roncaglio - *La Clinica Veterinaria,* 1911.

8) Zibordi - *Il Nuovo Ercolani,* 1911.

9) Favero - *La Clinica Veterinaria,* 1911.

10) Granucci - " " "

11) De Gasperi - *Giornale R. Accad. Veter. di Torino,* 1911.

12) Casalotti - *Biochimica e Terapia sper.* t. III.

13) Lebre - *Zeitschr. f. Immunitätserf* Bd. 12.

14) A. Ascoli - *La Clinica Veterinaria,* 1911, 1912, ecc.

15) Silva - *La Clinica Veterinaria,* 1912.

16) Iwicki-*Berl. tierärztl. Woch.,* 1912.

17) Zagaja - " " "

18) Isabolinsky und Patzewitsch - *Centralbl. f. Bakt. O. Abt.* I. Bd. 67.

19) - Gauss. *Centralbl. f. Bakt. Ref.* Bd. 56.

20) Reinhart - *Zeitschr. f. Fleisch - u. Milch Hyg.,* 1912.

21) Hecht - *Centralbl. f. Bakt. O. Abt.* I., Bd. 67.

22) Kraus - *Wien. klin. Woch.* 1897.

23) Taranuchin, rif. in *Baumgarten's Jahresbericht,* 1903.

24) Bielonowsky - *Arch. de Sciences biol. de St. Petersb.,* 1904.

25) Fornet - *Münch. mediz. Woch.,* 1906.

26) Maassen - *Arb. a. d. Kais Ges. - Amte,* Bd. 19.

27) - Otto *Zeitschr. z. secks, Geb. v. R. Koch,* 1903.

L'IGIENE MODERNA

PERIODICO MENSILE — Esce il 15 d'ogni mese

ANNO VI - N. 8 - AGOSTO 1913

Amministrazione e Redazione: Via XX Settembre, N. 3-2

Editori: F. FUMAGALLI & C. — GENOVA